Biologia Celular – Profa. Dra. Marilanda F. Bellini

1 Importância da Biologia Celular

O estudo do mundo vivo mostra que a evolução produziu uma imensa variedade de formas. Existem em torno de quatro milhões de espécies diferentes de bactérias, protozoários, vegetais e animais, que diferem em sua morfologia, função e comportamento. Entretanto sabe-se agora que, quando os organismos vivos são estudados a nível celular e molecular, observa-se um plano único principal de organização. O objetivo da biologia celular é a análise das células que constituem as unidades estruturais de todas as formas de vida.

Há muito tempo atrás se observou que uma única célula poderia constituir um organismo inteiro, como no caso dos protozoários (Figura 1), ou ser uma das muitas, agrupadas e diferenciadas em tecidos e órgãos, para formar um organismo multicelular. Assim sendo, a célula é a unidade estrutural e funcional básica dos organismos vivos.

A

B

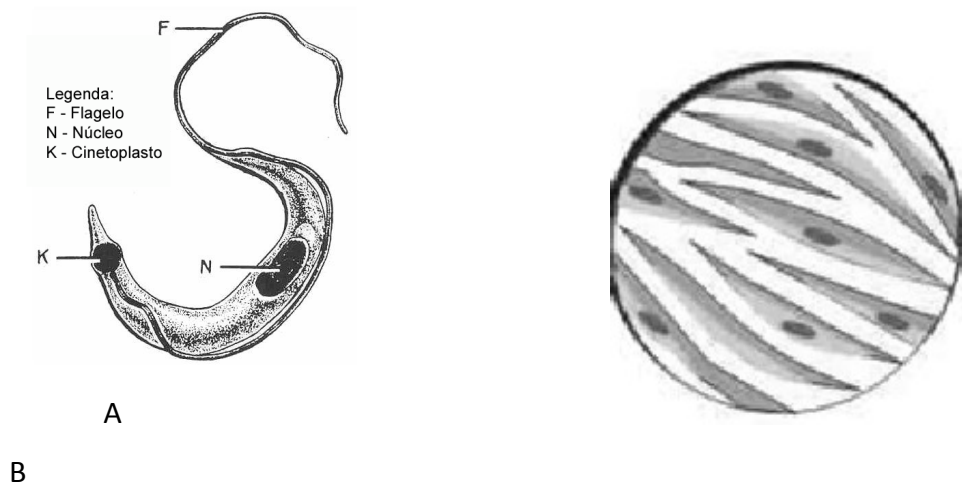



Figura 1. Tipos celulares: A. *Trypanosoma cruzi* (protozoário), uma única célula constitui um organismo; B. células agrupadas e diferenciadas em tecido muscular liso.

2 Instruções gerais ao aluno

1. Use o tempo de laboratório para realizar todos os exercícios da aula prática. Leia antes da aula as instruções de cada exercício.

2. Arrume em ordem o material necessário para a aula prática. Isso evita confusão. Não deixe bolsas ou outros objetos desnecessários próximos ao local de trabalho.

3. Siga todas as instruções cuidadosamente. Caso não consiga bons resultados seja persistente e repita o exercício. Lembre-se: "Ciência é Repetição". Somente com um trabalho exato você pode obter resultados precisos.

4. Ao final de cada exercício elabore os desenhos das observações e responda às questões. Não se esqueça de colocar as legendas e o aumento obtido com o uso do microscópio.

5. Não jogue o material usado no chão ou nos balcões. Deixe o seu lugar tão limpo como gostaria de encontrar.

6. Desligue o microscópio; tire o fio da tomada; verifique se as objetivas estão limpas e coloque a de menor aumento na posição correta. Não se esqueça de tirar a lâmina utilizada no último exercício!

7. Coloque a capa no microscópio.

MATERIAIS NECESSÁRIOS

- 1 avental branco de uso obrigatório para todas as aulas práticas
- 1 lápis preto
- 1 borracha
- 1 caixa ou estojo para colocar o material

3 Conhecendo o Microscópio de Luz

3.1 Definição

O microscópio de luz (ML) é um instrumento que permite observar objetos de pequenas dimensões ou invisíveis a olho nu. Fornece uma imagem consideravelmente aumentada, geralmente invertida da esquerda para a direta, devido à associação de lentes.

Figura 2. Microscópio de luz (ML).

3.2 Partes do microscópio de luz

O microscópio de luz é constituído por duas partes – uma parte mecânica e uma parte óptica.Cada parte engloba uma série de componentes constituintes do microscópio

3.2.A Partes mecânicas

A parte mecânica serve para dar estabilidade e suportar a parte óptica. Esta parte é constituída por:

a) **Base ou pé**: o pé sustenta todo o conjunto do MO podendo ser triangular, redondo, oval ou de outra forma qualquer desde que seja amplo, sólido e pesado a fim de suportar essa sustentação.
b) **Braço, Coluna ou Estativa:** esta se articula com o pé sustentando o tubo do microscópio onde se encontram as lentes.
c) **Platina:** é uma mesa em miniatura, perpendicular ao grande eixo do microscópio, que sustenta a lâmina e tem orifício no centro dando passagem para a luz. A lâmina é presa por meio de pinças ou garras e desloca-se por meio de um mecanismo de deslizamento, provido de botões que se movimentam chamados *charriot*. Na platina há também um sistema de escalas para a marcação de pontos.
d) **Canhão ou tubo:** faz a comunicação entre as partes ópticas de resolução e ampliação, ou seja, entre a objetiva e a ocular.
e) **Revólver:** peça giratória do tubo que proporciona a fixação e troca de objetivas.
f) **Parafuso Macrométrico:** permite movimentos mais grosseiros da platina em direção as objetivas ou vice-versa.
g) **Parafuso Micrométrico:** permite movimentos menores mais delicados da platina em direção às objetivas ou vice-versa, para focalização complementar. Localiza-se próximo ao parafuso micrométrico ou adaptado sobre ele. Em certos microscópios, só existe um parafuso em lugar do macro e do micrométrico (roda de enfoque).
h) **Parafuso condensador:** também se situa na porção inferior da coluna, destinando-se a elevar e abaixar o condensador.

3.2.B Partes Ópticas

A parte óptica é composta por um conjunto de meios transparentes que conduzem o feixe luminoso usado na microscopia. As lentes biconvexas são reunidas em dois sistemas: **objetivas**, situadas próximas ao objeto que se observa, e **oculares**, próximas ao olho do observador.

a) **Objetivas:** as objetivas, situadas sempre próximas do objeto que é observado no microscópio, constituem-se em sistemas centrados de lentes convergentes que formam a imagem, real e invertida do objeto. Essa imagem é que é

acompanhada pela ocular e tornada definitiva. Chamam-se objetivas a seco quando são empregadas usando ar entre a objetiva e o objeto examinando e chamam-se de imersão quando se coloca um óleo transparente, de índice de refração o mais próxima possível da lente, entre esta e o objeto. O óleo usado é óleo de cedro ou sucedâneo sintético com a finalidade de tornar mais claro o campo do microscópio, o que acontece quando o óleo homogeneíza o meio de luz entre esses dois elementos.

b) **Oculares:** as oculares são formadas por sistemas de lentes cuja posição está sempre próxima ao olho do observador. Sua finalidade é recolher a imagem aumentada, vertical a direta. Como a imagem que a objetiva fornece é invertida, a imagem, final do microscópio será também invertida. As oculares são formadas por duas lentes, a superior (lente ocular) e a inferior (lente de campo ou colética).

Outros elementos são importantes constituintes da parte óptica de um microscópio, dentre eles pode-se citar:

c) **Fonte Luminosa:** pode ser distante, como a luz solar ou próxima como a luz de uma lâmpada. Os microscópios modernos, mais aperfeiçoados, possuem uma lâmpada embutida.

d) **Diafragma-íris:** quando for conveniente, pode-se limitar parte dos raios periféricos que chegam ao objeto. Para tanto, o microscópio dispõe de um diafragma-íris que permite diminuir a abertura de entrada do feixe luminoso.

e) **Condensador:** é possível também aumentar a quantidade de luz que atravessa o objeto, tanto no caso da luz ser fraca, como no caso em que o aumento da objetiva exige raios mais intensos. Neste caso, usa-se um dispositivo auxiliar - o condensador - que condensa os raios luminosos.

f) **Filtros:** os filtros são discos de vidro coloridos ou recobertos com gelatina colorida que absorvem uma parte das radiações luminosas que atingem o objeto, permitindo utilizar faixas estreitas de comprimento de onda proporcional, para uma dada objetiva, ao comprimento de onda da luz empregada. O uso dos filtros pode favorecer grandemente a absorção aumentando o poder de resolução. Além do mais, usando filtros de cores

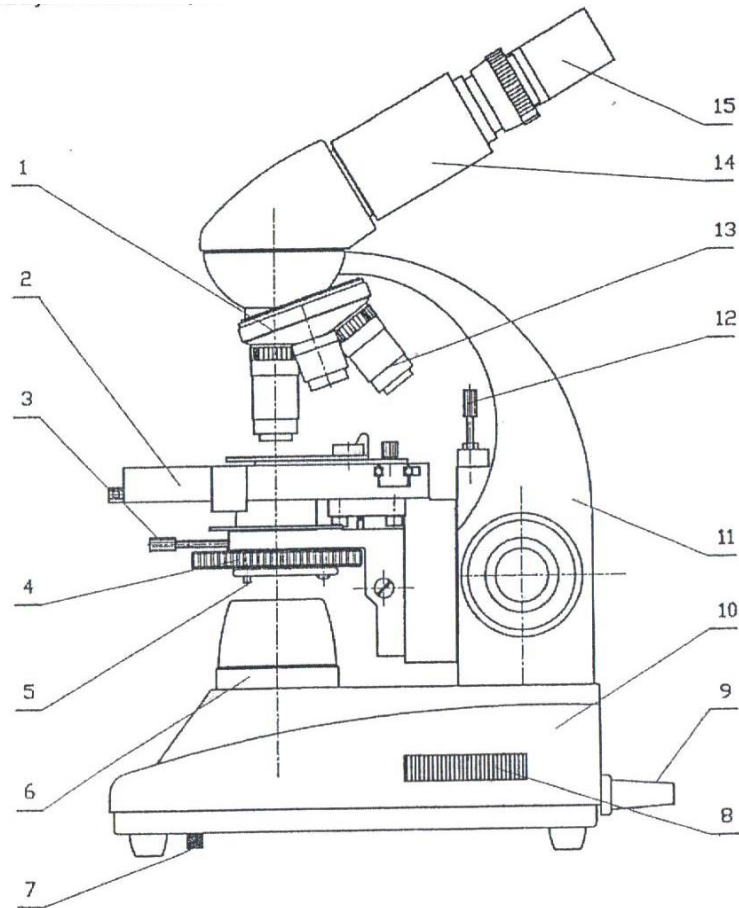
complementares é possível aumentar o contraste entre estruturas de formas pouco diferenciadas.

1. Revólver
2. Platina
3. Parafuso do Condensador
4. Diafragma da Íris
5. Suporte do Filtro
6. Lente Coletora
7. Parafuso para a Lâmpada
8. Ajuste da Intensidade de Luz
9. Entrada de Alimentação
10. Base
11. Corpo
12. Limitador de Foco
13. Objetivas
14. Cabeça Binocular
15. Oculares

Figura 3. Partes Mecânicas e Ópticas de um microscópio de luz. Fonte: Manual de Instruções: Microscópios Bioval, modelo L1000.

3.3 COMO UTILIZAR O MICROSCÓPIO

3.3. A SEQÜÊNCIA DE PASSOS PARA SE EFETUAR OBSERVAÇÕES AO MICROSCÓPIO DE LUZ

1. Retirar a capa do microscópio;
2. Identificar as diferentes partes do microscópio;
3. Ligar o microscópio no botão lateral;
4. Limpar a lâmina a ser examinada;
5. Ajustar o *Charriot* de modo a centrar o orifício da platina;
6. Colocar a lâmina sobre a platina (com a lamínula voltada para cima) e sobre a lente frontal do condensador;
7. Começar as observações, utilizando-se a objetiva de menor aumento (panorâmica). Identificar o sinal de que a objetiva está em posição correta;
8. Ajustar o condensador, obtendo-se iluminação de Köhler (Atividade 1);
9. Ajustar as oculares para a obtenção de uma única imagem:

Para se obter uma imagem nítida com qualquer aumento, deve-se prosseguir da seguinte forma:

a) Colocar a preparação corretamente para a observação com uma objetiva de amplitude média;
b) Ajustar a distância interpupilar;
c) Enfocar nitidamente o objeto com o olho direito (fecha-se o esquerdo), mediante a roda de enfoque;
d) Corrigir a nitidez da imagem para o olho esquerdo, por meio do anel de dioptrias.

Nota: este ajuste é necessário ser retomado sempre que mudar de observador.

10. Olhar pela ocular, ao mesmo tempo em que se eleva lentamente a platina, girando o parafuso macrométrico, até que a preparação apareça focalizada. Os ajustes finais de focalização devem ser efetuados com o parafuso micrométrico;
11. Se houver necessidade de efetuar observações com outras objetivas, exceto a objetiva de 100x (imersão), girar o revólver e encaixar a objetiva adequada. Se a focalização não for automática, faça uso do parafuso micrométrico;

12. Deslocar a lâmina sobre a platina, utilizando o *charriot*, a fim de efetuar observações em toda sua extensão;
13. Ao efetuar a mudança de objetiva, certificar-se de que a iluminação de Köehler continua sendo mantida;

As objetivas de imersão são utilizadas à menor distância do material a ser analisado, o que contribui para captarem maior quantidade de luz dele proveniente.

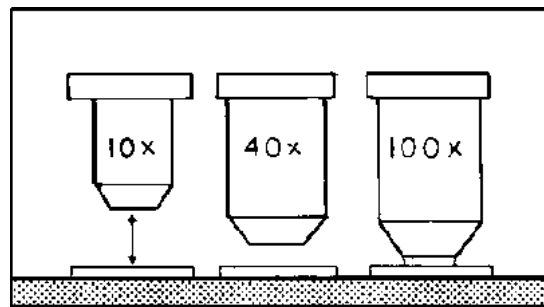



Figura 4. Diferentes distâncias entre objetivas e material a ser analisado.

Fonte: http://www.nzetc.org/tm/scholarly/Bio23Tuat01-fig-Bio23Tuat01_011a.html

Início da Observação:

a) Verifique se o microscópio está em perfeitas condições de uso, com relação à luz, objetivas, oculares, etc;
b) Caso as oculares estejam empoeiradas ou com impressões digitais nas lentes, remova-as delicadamente com um pano macio ou com um lenço de papel;
c) Limpe a platina com um pedaço de papel higiênico, caso ela esteja molhada ou empoeirada.

Para Colocar a Objetiva de Imersão:

a) Enfocar a preparação nitidamente, seguindo a escala de magnitude das objetivas em ordem crescente (sentido horário);
b) Após o enfoque nítido com a objetiva imediatamente anterior à imersão, girar o revólver de modo a formar um V invertido entre as duas objetivas (40x e 100x);
c) Colocar uma gota de óleo sobre a preparação, justamente no centro da lâmina, onde aparece o anel luminoso;
d) Encaixar a objetiva de imersão e enfocar a imagem com nitidez.

Durante a Observação:

a) Não molhe a platina, nem as objetivas;
b) Tenha cuidado ao usar substâncias químicas corrosivas e/ou corantes, para não danificar o aparelho.

Para Retirar a Objetiva:

a) Girar o revólver no sentido horário, encaixando a objetiva panorâmica.
b) Retirar o óleo da objetiva de imersão com um lenço de papel e também da preparação.

Após a Observação:

a) Verifique se a lâmpada está apagada;
b) Voltar o microscópio para posição de descanso (objetiva panorâmica e platina abaixada);
c) Limpe a objetiva de imersão com álcool-éter;
d) Caso tenha molhado a platina, enxugue-a muito bem;
e) Não se esqueça de cobrir o microscópio.

Nota: Não arraste nem empurre o microscópio. Ele está disposto sobre a bancada de maneira adequada à observação.

14. Quando desejar retirar a lâmina do microscópio, girar o revólver de modo a deixar a objetiva panorâmica em posição de observação. Abaixar a platina girando o parafuso macrométrico. Remover a lâmina com cuidado para que os dedos não toquem as lentes das objetivas e para que a lâmina não toque nas mesmas.
15. Ao terminar:
    a) Não esqueça a lâmina no *Charriot*;
    b) Desligar a luz e retirar o fio da tomada;
    c) Colocar a capa no microscópio;
    d) Limpar a mesa.

3.3.B PODER E LIMITE DE RESOLUÇÃO

Poder de Resolução de um sistema óptico refere-se à sua capacidade de formar imagens distintas (separadas) de dois pontos situados muito próximos um do outro, no objeto observado. Depende essencialmente da objetiva, ou seja, de sua abertura numérica (AN) e do comprimento de onda de luz utilizada. Quanto maior for a abertura numérica e menor for o comprimento de onda de luz utilizada, maior é o poder de resolução da objetiva. A abertura numérica depende do índice de refração do material colocado diante da objetiva e é dada pela seguinte fórmula matemática:

n = índice de refração do meio de montagem

sen de α fornecido pelo fabricante da lente em questão

AN = n.senα

Logo, aumentando-se o valor de *n*, aumentamos também o valor de AN. Isso significa que maior quantidade de luz penetrará na lente objetiva perdendo-se menos luz por refração e reflexão. O olho humano desarmado tem um poder de resolução de aproximadamente 0,2 mm e o microscópio óptico em torno de 0,2 µm.

Observação: $n_{óleo}$*= 1,52* n_{ar}*= 1,00*

Limite de Resolução (LR) refere-se à menor distância que deve existir entre os dois pontos mencionados, de modo que ainda apareçam individualizados na imagem formada pelo sistema óptico utilizado. LR depende do comprimento da onda de luz utilizada (λ) e da abertura numérica da objetiva (AN).

Portanto:

Portanto, o limite de resolução é o inverso do poder resolutivo; de modo que, quanto maior for o poder de resolução menor será o seu limite.

O aumento total conferido pelo MO é o produto do aumento conferido pela lente objetiva e pela lente ocular (objetiva x ocular).

Atividade 1. Iluminaçâo de Köehler

Esse método de iluminação foi idealizado por A. Köehler e proporciona um melhor rendimento do sistema óptico, sendo, portanto, imprescindível para um microscópio ou fotomicroscópio de qualidade. Para a obtenção deste tipo de iluminação as seguintes manobras devem ser realizadas:

a) Focalizar a luz do microscópio com a objetiva 4x (ou 5x);
b) Fechar o diafragma da lente coletora. Excursionar o parafuso do condensador para cima e para baixo até que se observem as bordas do diafragma em foco. Observar a imagem formada.
c) Se a imagem estiver deslocada do centro (Figura 5A), ajustar os dois parafusos de centralização do condensador (da frente) até que a imagem do diafragma fique bem no centro do campo (Figura 5B);
d) Abrir o diafragma da lente coletora até que encha o campo (Figura 5C);
e) Fechar gradualmente o diafragma da lente coletora até que a intensidade luminosa comece a diminuir.

Observação: Se o microscópio for dotado de campo luminoso ou iluminador (na base), este deve ser utilizado no lugar do diafragma íris da lente coletora nos itens b e d.

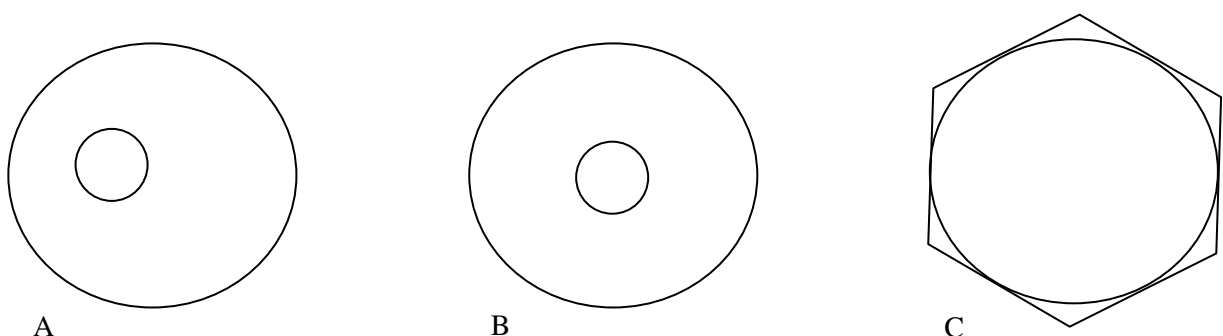
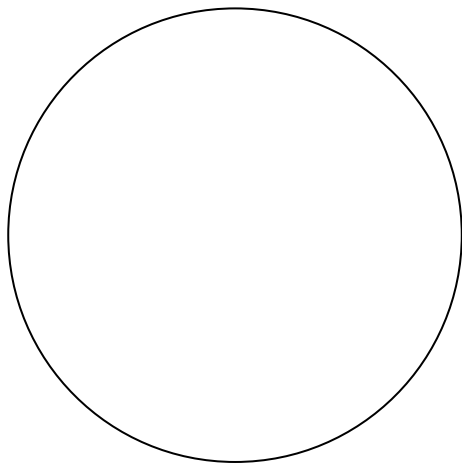
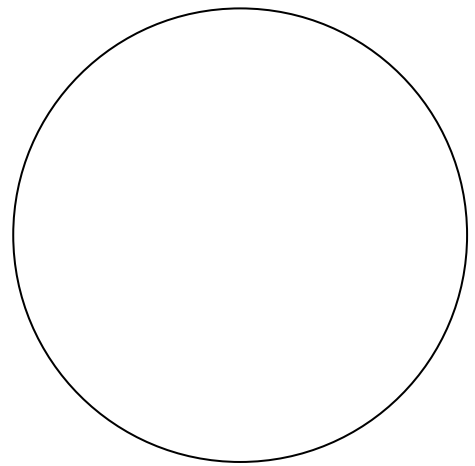
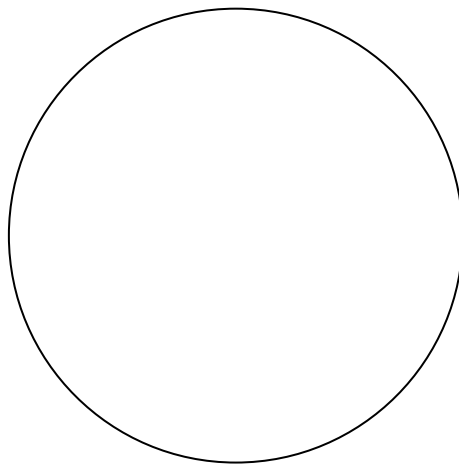



Figura 5. Passos para se obter a Iluminação de Köehler: A. bordas do diafragma em foco; B. imagem do diafragma no centro do campo; C. Abrir o diafragma da lente coletora até que encha o campo.

Atividade 2: Formação da Imagem no Microscópio

Verifique a imagem formada pelo microscópio utilizando uma lâmina com uma letra colada (jornal ou digitada). Como você explica a diferença entre a imagem observada a olho nu e ao microscópio? Passando para as objetivas seguintes, o que você pode dizer quanto ao tamanho da imagem, tamanho do campo de visão e a textura do papel? Faça um desenho do que observou com cada objetiva. Anote o aumento total em cada campo.

Objetiva: 4X Aumento:____

Objetiva: 10X Aumento:____

Objetiva: 40X Aumento: ____

Considerações:____

____

Atividade 3: Componentes do Microscópio X Funções

PALAVRAS CRUZADAS

- **Horizontal**

1- Peça que está localizada na mesa do microscópio e serve para prender a lâmina.

2- Parte do microscópio responsável pelo foco da imagem.

3- Sustenta as objetivas.

4- Parte do microscópio que o sustenta.

5- Controla a intensidade da luz.

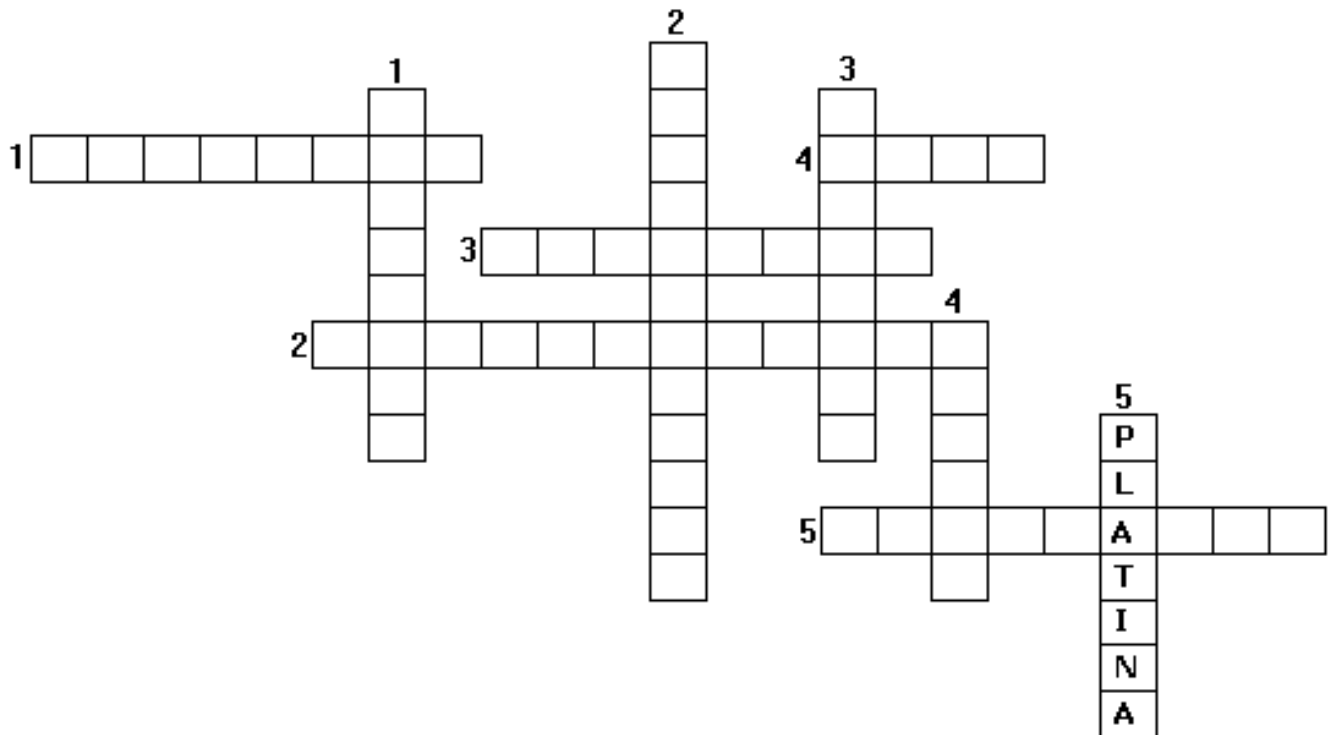
- **Vertical**

1- Peça do microscópio que movimenta a lâmina.

2- Parte do microscópio que movimenta a mesa no sentido vertical.

3- Diz-se de 10x, 40x ou 100x. Responsável pelo aumento da imagem.

4- Parte do microscópio que está diretamente ligado ao observador

5- PLATINA (parte do microscópio que acomoda a lâmina)

Atividade 4: Fixação de Conteúdos

1. Como se distingue a objetiva utilizada para imersão em óleo das demais objetivas? Como se deve proceder para focalizar uma preparação com a objetiva de imersão em óleo?

____

____

____

____

____

____

2. O que é Poder de Resolução?

____

____

____

____

3. Calcule o Limite de Resolução do quadro abaixo.

Ocular	Objetiva	AN da objetiva	Aumento Total	Limite de Resolução (μm)
10×	4×	0,10		
10×	10×	0,25		
10×	40×	0,65		
10×	100×	1,25 oil		

Dados: K= 0,61; λ da luz branca= 0,55 μm (valor médio para a faixa visível)

a) Que combinação de lentes fornece o maior aumento?

____

b) Que combinação de lentes fornece uma imagem com mais detalhes?

____

c) O que ocorreria com o nível de detalhamento da imagem se a ocular da primeira combinação de lentes fosse de 20×? Justifique.

____

____

____

4. Como se calcula o aumento final de um material observado ao microscópio?

____

____

____

____

5. Descreva o trajeto da luz do microscópio, nomeando pela ordem, os objetos (parte óptica) que se encontram nesse trajeto durante a observação microscópica.

____

____

____

____

6. Cite a parte do microscópio responsável pelo embaçamento ou falta de nitidez da imagem e, quando isto ocorrer, como deve se proceder à adequada correção desse problema.

____

____

____

____

7. Faça um esquema mostrando o significado do que está escrito na armadura das objetivas.